

巴西橡胶树 *HbERFB4-1* 基因的克隆和表达分析

朱家红^{1,2}, 邱琼^{1,2}, 畅文军², 张治礼^{2,3}

(1. 海南大学农学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海口 571101; 3. 海南省农业科学院, 海口 571000)

摘要: 根据 EST 序列信息, 利用 RACE 技术分离了巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)的 1 个 AP2/ERF 类基因, 命名为 *HbERFB4-1*。该基因 cDNA 全长 732 bp, 含有完整的开放阅读框架, 编码 147 个氨基酸, 不含内含子。推导的 *HbERFB4-1* 氨基酸序列与杨树(*Populus trichocarpa*)、蓖麻(*Ricinus communis*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和大豆(*Glycine max*)中相应蛋白氨基酸序列的一致性分别为 78%、71%、62% 和 55%, 具有典型的 AP2 类蛋白结构特征。聚类分析表明, *HbERFB4-1* 属于 ERF 家族 B4 亚族。半定量 RT-PCR 分析结果表明, 该基因在胶乳中的表达量相对较低, 但乙烯利刺激后其在胶乳中的表达量迅速增加, 推测该基因可能参与了胶乳中乙烯信号的转导。

关键词: 巴西橡胶树; AP2/ERF 类基因; 乙烯利; 基因表达

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.02.006

Cloning and Expression Analysis of *HbERFB4-1* Gene in *Hevea brasiliensi*

ZHU Jia-hong^{1,2}, QIU Qiong^{1,2}, CHANG Wen-jun¹, ZHANG Zhi-li^{2,3*}

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou, 570228, China; 2. Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 3. Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou 571100, China)

Abstract: Based on EST sequences from an ethephon-induced latex SSH cDNA library of *Hevea brasiliensis*, a full-length cDNA encoding AP2/ERF type gene named as *HbERFB4-1*, was cloned from *H. brasiliensis* by RACE-PCR. The *HbERFB4-1* cDNA has full length of 732 bp with an open reading frame (ORF) of 444 bp, and encodes 147 amino acid residues. No introns were detected in *HbERFB4-1* gene. The deduced *HbERFB4-1* contains an AP2 domain and three NISs, which shows high identity to AP2/ERF in *Populus trichocarpa*, *Ricinus communis*, *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max*, counting for 78%, 71%, 62% and 55%, respectively. Phylogenetic analysis showed that *HbERFB4-1* belonged to the B4 subfamily of ERF family. Semi-quantitative RT-PCR analysis indicated that the transcription of *HbERFB4-1* in latex was low, but it was rapidly induced by ethephon, suggesting that *HbERFB4-1* is involved in the ethylene signal pathway in latex of *H. brasiliensis*.

Key words: *Hevea brasiliensis*; AP2/ERF type gene; Ethephon; Gene expression

AP2/ERF 类转录因子是高等植物中一类重要的转录因子, 通过与靶基因启动子区域中富含 GC 的顺式作用元件(如 DRE 元件、GCC-box 等)结合调控基因转录, 进而参与调控植物细胞周期、生长发

育、细胞增殖、次生代谢、生物和非生物胁迫应答及植物激素信号传导等多种信号途径^[1-6]。该类转录因子含有由 60~70 个氨基酸残基组成的高度保守的 AP2/ERF DNA 结构域。根据 AP2 结构域的

收稿日期: 2011-07-01 接受日期: 2011-09-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000313); 海南省自然科学基金项目(309052); 中央级公益性科研院所业务费专项资金资助项目(ITBB110201)资助

作者简介: 朱家红(1982~), 男, 硕士, 助理研究员, 从事植物生理与分子生物学研究。E-mail: hjzhu1010@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zzl_catas@hotmail.com

数量和序列结构,又将其分为 5 个族:AP2 族、RAV 族、DREB/CBF 族、ERF 族和其它类别,其中 ERF 族又分 6 个亚族:B1、B2、B3、B4、B5 和 B6 亚族^[5,7]。

乙烯利能够刺激橡胶树增产,但对乙烯利刺激橡胶树增产过程中的信号转导、增产机制等分子基础仍不清楚^[8]。为了揭示乙烯利刺激橡胶树增产的分子机制,我们利用 SSH 技术构建了乙烯利诱导表达的胶乳 cDNA 文库,通过 PCR 和斑点杂交验证,获得了一个与 AP2/ERF 家族基因同源性较高、乙烯利诱导高度表达的 No. 30 EST 基因。以此为基础,本研究对该基因的全长 cDNA 序列进行了扩增,并对其结构和表达特征进行了分析,为深入研究该基因的功能及其在橡胶树乙烯信号传导中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

以种植于中国热带农业科学院实验农场的巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)无性系 RRIM600 为材料。选取 6 年生的未开割树进行乙烯利处理,分别于处理 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 后采集胶乳并迅速置于液氮中冷冻,−70℃ 下保存。胶乳处理参考 Hao 等^[9]的方法;胶乳总 RNA 的提取参照张治礼等^[10]的方法;叶片、根、皮和花的总 RNA 提取参照试剂盒说明书;叶片 DNA 提取参照傅荣昭等^[11]的方法。

1.2 试剂

SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 CLONTECH 公司;TranZol 试剂盒购自全式金公司;IPTG、X-Gal、dNTPs、pGEM-T easy Vector 购于 Promega 公司;其它生化试剂和常规试剂均为超纯和分析纯。

1.3 巴西橡胶树 *HbERFB4-1* 基因的克隆

先前获得的与 AP2/ERF 家族基因同源性较高、乙烯利诱导高度表达的 No. 30 EST 序列有 556 bp, 包含有终止密码子 TAA。根据序列,设计了 5' RACE 特异性引物 GSP1:5'-TGGTATTGGTATTCA-TTTGGG-3' 和通用引物 UPM:5'-CTAATACGACTC-ACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'。*HbERFB4-1* 基因 5' 端的扩增参照 CLOTECH 公司的 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行。

将扩增出的 DNA 连接到 pGEM-T 载体上进行序列测定,对所获得的序列和已有的 EST 序列进行拼接并分别在 5' 端起始密码子的上游和 3' 端终止密码子的下游设计特异引物 F1:5'-CACACCTG-AAAAACAAGAA-3', F2:5'-TAGTTACCAATTTAA-TAAGCC-3', 分别以胶乳 cDNA 和叶片 DNA 为模板进行扩增,将扩增的 DNA 片段连接到 pGEM-T 载体上,测序后将结果与拼接结果进行比较。利用网上数据库进行 BLAST 分析,利用 DNAMAN 软件进行序列比对。

1.4 氨基酸序列分析和系统进化树构建

蛋白质序列分析以 <http://www.expasy.org> 网站相关软件完成;核定位信号分析通过 <http://wolfsort.org/> 网站完成。用 DNAMAN 程序软件从 GenBank 中挑选不同物种 AP2/ERF 类基因编码的氨基酸序列比对分析:将橡胶树中的 *HbERFB4-1* 基因的氨基酸序列与拟南芥中不同亚族的 ERF 类转录因子的序列进行系统进化树分析。

1.5 巴西橡胶树 *HbERFB4-1* 基因的表达分析

分别取乙烯利处理 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 后的橡胶树胶乳总 RNA 及不同组织提取的 RNA 反转录成 cDNA,以 18S rRNA 为内参进行半定量 RT-PCR 分析。用于半定量 RT-PCR 的基因特异引物为 F1 和 F2;18S rRNA 引物为 P1 (5'-CAGTGGTC-GTACAACTGGTAT-3') 和 P2 (5'-ATCCTCCAATCC-AGACACTGT-3')。反应程序为:94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 25 个循环后再延伸 10 min。反应结束后取 10 μL 反应液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果和分析

2.1 基因的克隆和特征分析

通过对已有的 No. 30 EST 序列进行分析,该序列与其他植物中的 AP2/ERF 类基因一致性较高,并含有起始密码子 TAA,表明该 EST 序列可能为巴西橡胶树胶乳 AP2 基因的 5' 端序列。在此基础上设计 5' RACE 引物对基因 5' 端进行扩增,结果获得了 400 bp 左右的片段。经回收、克隆和测序后证实,该扩增片段长 385 bp (图 1)。利用 DNAMAN 软件对上述分离得到的 2 个 cDNA 进行序列拼接,获得了 1 个含有完整开放阅读框的 cDNA 序列。分别在 5' 端起始密码子的上游和 3' 端终止密码子的下

游设计特异引物,分别以 cDNA 和 DNA 为模板进行扩增,分别获得 500 bp 左右的特异片段,测序结果表明两个特异片段序列完全一样且与拼接结果一致,表明获得了基因的全长 cDNA 序列,且该基

因不存在内含子。该基因 cDNA 全长 732 bp,包含一个 444 bp 的开放阅读框,编码 147 个氨基酸,5'端非编码区长 135 bp,3'非编码区长 153 bp(图 1)。

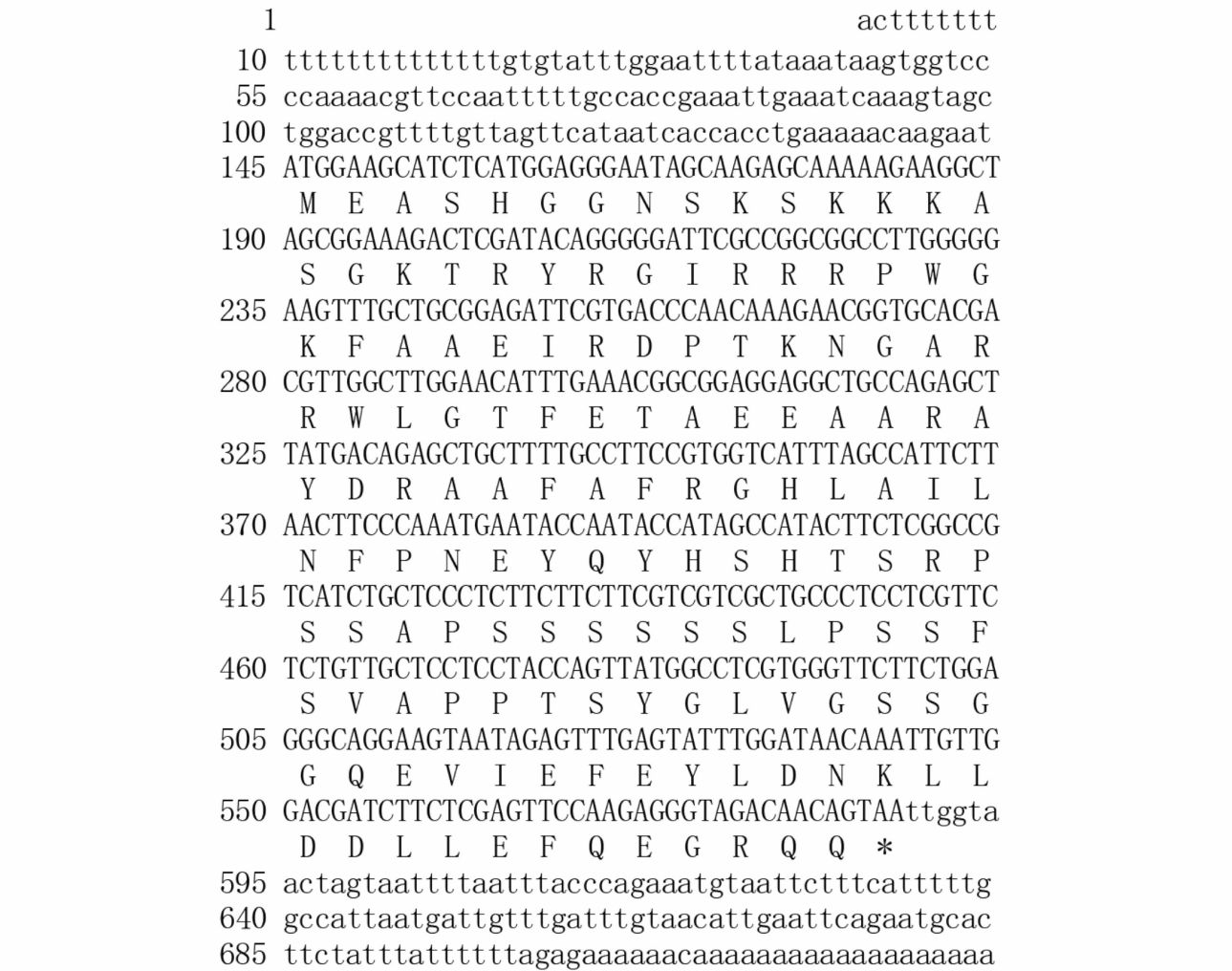


图 1 *HbERFB4-1* 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *HbERFB4-1*

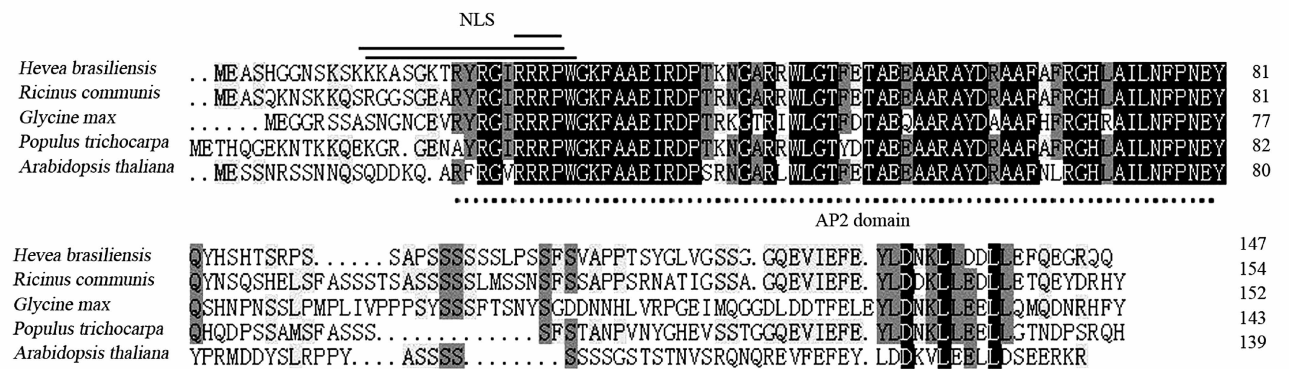


图 2 *HbERFB4-1* 与其它 4 种植物中 ERF 类转录因子的序列比对

Fig. 2 Sequence alignment between *HbERFB4-1* and ERF transcription factor in other plants

在 GenBank 中检索, *HbERFB4-1* 编码的氨基酸序列与杨树 (*Populus trichocarpa*)、蓖麻 (*Ricinus communis*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和大豆 (*Glycine max*) 中相应的氨基酸序列的一致性较高, 分别达 78%、71%、62%、55%, 属于 ERF 家庭成员 (图 2)。该蛋白序列具有典型的 AP2/ERF 家族转录因子结构特征, 包含 1 个由 60 个氨基酸组成的 AP2 保守结构域(虚线处)和 3 个核定位序列(NLS) (分别是 RRRP、KKKASGKTRYRGIRRRP 和 KKASGKTRYRG-IRRRPW)。

2.2 蛋白序列系统进化分析

ERF 家族转录因子根据 DNA 结合域保守氨基酸残基的特点可分为 B1、B2、B3、B4、B5 和 B6 共 6 个亚族。为了进一步分析本研究所获得的 ERF 与 AP2/ERF 家族相关转录因子之间的进化关系, 选取了拟南芥 AP2/ERF 家族转录因子进行同源进化比对, 构建同源进化树。结果表明, 本研究所获得的 ERF 处于 ERF-B4 分支上, 在进化关系上属于 ERF 家族转录因子 ERF-B4 亚族(图 3), 因此把所克隆的基因命名为 *HbERFB4-1*。

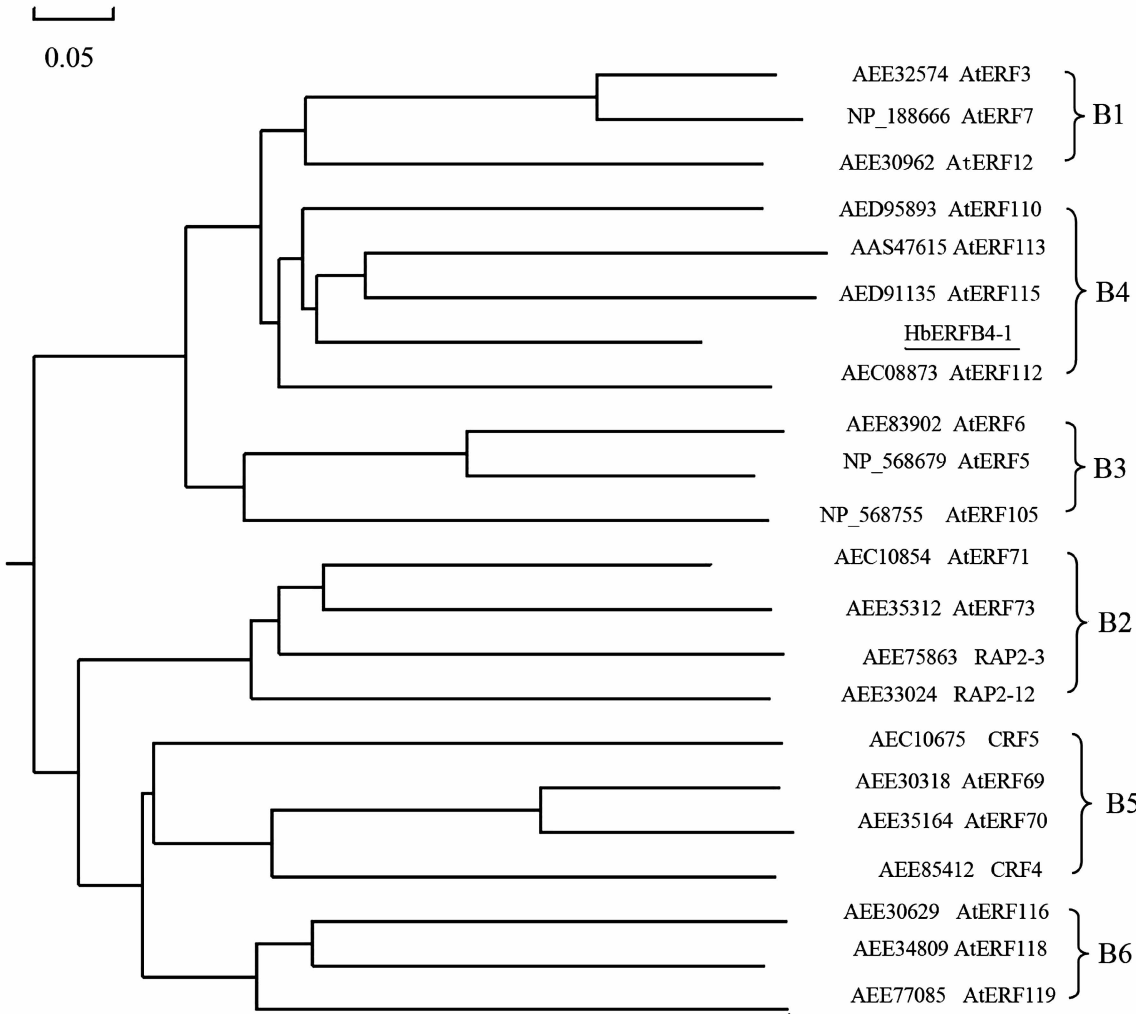


图 3 *HbERFB4-1* 与拟南芥 AP2/ERF 转录因子的进化分析
Fig. 3 Phylogenetic analysis of *HbERFB4-1* and AP2/ERF transcription factors in *Arabidopsis thaliana*

2.3 *HbERFB4-1* 的表达分析

为了检测 *HbERFB4-1* 在不同组织中及乙烯利刺激下的表达情况, 分别以巴西橡胶树的根、皮、花、叶及乙烯利处理 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 后的胶乳 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 进行半定量 RT-

PCR 分析。结果表明, *HbERFB4-1* 在所检测的组织中都有表达, 且在根和胶乳中的表达量相对较低, 但乙烯利刺激 3 h 后胶乳中 *HbERFB4-1* 的表达量大幅增加, 此后逐渐降低, 但 24 h 后仍高于对照 (图 4), 这说明 *HbERFB4-1* 能被乙烯利诱导表达。

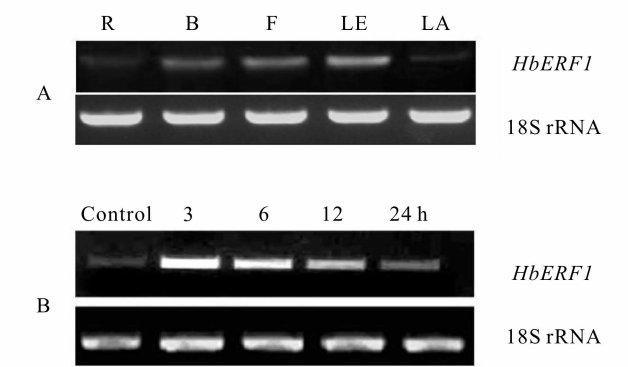


图 4 *HbERFB4-1* 的表达。A. *HbERFB4-1* 在根(R)、皮(B)、花(F)、叶(LE)和胶乳(LA)中的表达;B. 乙烯利刺激下 *HbERFB4-1* 的表达。
Fig. 4 Expression of *HbERFB4-1*. A. Expression of *HbERFB4-1* in root (R), bark (B), flower (F), leaf (LE) and laticifer (LA); B. Expression of *HbERFB4-1* with ethephon treatment.

3 讨论

以前的研究一直认为,AP2/ERF 转录因子家族是植物中特有的转录因子,但后来在嗜热四膜虫、束毛藻和病毒中也发现了 AP2/ERF 转录因子^[12-13]。Mzgnani 等^[13]认为病毒或细菌基因的横向转移是植物中 AP2 基因的起源,ERF 亚族祖先的内含子进化可能发生在扩增和分化之前,是单源进化,所以现在大多数的 AP2 基因都没有内含子。在拟南芥 147 个 AP2 基因中仅 23 个含有内含子。拟南芥 AP2 亚族和 Rav 亚族的基因都有内含子,但 ERF 亚家族中仅 4 个基因有内含子,这预示着内含子在扩增之前就发生了进化,在一些早期的 AP2 基因中内含子被丢弃了。本研究获得的 *HbERFB4-1* 基因是 AP2/ERF 家族转录因子 ERF-B4 亚族基因,该基因全长 732 bp,编码 147 个氨基酸,基因中没有内含子,这也进一步证实了 Mzgnani 等的观点。

通过对模式植物拟南芥乙烯信号转导途径的研究表明,乙烯信号的转导是由内质网上乙烯受体识别乙烯开始,在胞质中经一条保守的途径,由 EIN3/EIL1 将转录信号传递至细胞核中,最后以 AP2/ERF 类转录因子通过与 GCC 盒特异结合来激活或抑制相关基因的表达^[14]。由此可见,AP2/ERF 类转录因子在乙烯信号传递途径中具有重要的功能。乙烯利能够刺激橡胶树的增产,但对其增产的分子生物学基础仍不清楚。乙烯利刺激橡胶树首先涉及到乙烯信号转导,揭示乙烯信号转导可能是阐明乙烯利刺激橡胶树增产的关键。本研究获得的 AP2/ERF 转录因子基因 *HbERFB4-1* 在胶乳中的表达量相对较低,但乙烯利刺激 3 h 后其表达量迅速增加,这说明

HbERFB4-1 能被乙烯利诱导表达,可能参与了橡胶树胶乳中的乙烯信号传导途径,为进一步阐明乙烯利刺激橡胶树增产的机理奠定了基础。

AP2/ERF 类转录因子对植物的次生代谢也起着十分重要的调节作用。长春花 (*Catharanthus roseus*) AP2/ERF 类蛋白基因 *ORCA2* 和 *ORCA3* 具有参与吲哚萜类生物碱的合成调控的功能^[15-16]。橡胶树的乳管细胞中,橡胶生物合成的单体是异戊二烯,其直接前体为甲羟戊酸,橡胶的生物合成与其它植物的类异戊二烯次生代谢途径基本相同,是一种典型的植物类异戊二烯途径的次生代谢(即甲羟戊酸途径)^[17-18]。因此,AP2/ERF 类转录因子可能参与乳管细胞内的橡胶生物合成的调控,但 *HbERFB4-1* 是否参与了橡胶次生代谢的调控还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses [J]. Annu Rev Plant Biol, 2006, 57: 781-803.
- [2] Chen W J, Zhu T. Networks of transcription factors with roles in environmental stress response [J]. Trends Plant Sci, 2004, 9 (12): 591-596.
- [3] Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses [J]. Plant Physiol, 2009, 149 (1): 88-95.
- [4] Gutterson N, Reuber T L. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors [J]. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7(4): 465-471.
- [5] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, et al. Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice [J]. Plant Physiol, 2006, 140(2): 411-432.
- [6] Mitsuda N, Ohme-Takagi M. Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Physiol, 2009, 50 (7): 1232-1248.
- [7] Zhuang J, Deng D X, Yao Q H, et al. Discovery, phylogeny and expression patterns of AP2-like genes in maize [J]. Plant Growth Regul, 2010, 62(1): 51-58.
- [8] Zhu J H(朱家红), Zhang Q Q(张全琪), Zhang Z Z(张治礼). Ethephon stimulation on latex production and its molecular biological basis in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 2010, 46(1): 87-93.(in Chinese)
- [9] Hao B Z, Wu J L. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: Induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid [J]. Ann Bot, 2000, 85(1): 37-43.
- [10] Zhang Z L(张治礼), Yang Y(杨云), Liu K C(刘宽灿), et al. A rapid and efficient protocol for total RNA isolation from latex of *Hevea brasiliensis* [J]. Chin Bull Bot(植物学通报), 2007,

- 24(4): 516–520.(in Chinese)
- [11] Fu R Z(傅荣昭), Sun Y R(孙勇如), Jia S R(贾士荣). Technical Manual of Plant Genetic Transformation [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1994: 134–143.(in Chinese)
- [12] Wuitschick J D, Lindstrom P R, Meyer A E, et al. Homing endonucleases encoded by germ line-limited genes in *Tetrahymena thermophila* have APETELA2 DNA binding domains [J]. Eukaryot Cell, 2004, 3(3): 685–694.
- [13] Magnani E, Sjölander K, Hake S. From endonucleases to transcription factors: Evolution of the AP2 DNA binding domain in plants [J]. Plant Cell, 2004, 16(9): 2265–2277.
- [14] Benavente L M, Alonso J M. Molecular mechanisms of ethylene signaling in *Arabidopsis* [J]. Mol Biosyst, 2006, 2(3/4): 165–173.
- [15] van der Fits L, Memelink J. ORCA3: A jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism [J]. Science, 2000, 289(5477): 295–297.
- [16] Menke F L H, Champion A, Kijne J W, et al. A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2 [J]. EMBO J, 1999, 18(16): 4455–4463.
- [17] Chen D H(陈大华), Ye H C(叶和春), Li G F(李国风), et al. Advances in molecular biology of plant isoprenoid metabolic pathway [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 2000, 42(6): 551–558. (in Chinese)
- [18] Liu W P(刘卫平), Wang M J(王敏杰), Han Y Z(韩玉珍), et al. Biosynthetic mechanism of natural rubber [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 2002, 38(4): 382–388. (in Chinese)